

UNTERSUCHUNGEN
DER AKTIVITÄT UND KINETIK DER
FRUCTOSE-1-PHOSPHAT-ALDOLASE BEI
HEREDITÄRER FRUCTOSEINTOLERANZ
UND GESUNDEN KONTROLLEN MIT
EINER NEUEN RADIOMETRISCHEN
METHODE

Vinko Moro

*Diss
München
1985*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Kinderklinik der Universität München
Direktor: Prof.Dr.H.-B. Hadorn

UNTERSUCHUNGEN DER AKTIVITÄT UND KINETIK DER
FRUCTOSE-1-PHOSPHAT-ALDOLASE BEI HEREDITÄRER
FRUCTOSEINTOLERANZ UND GESUNDEN KONTROLLEN MIT EINER
NEUEN RADIOMETRISCHEN METHODE

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin an der
Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Vinko Moro
aus München

Jahr
1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität München

Betreuung durch Dr.rer.nat. Yoon S. Shin

Berichterstatter: Prof.Dr.med. W. Endres

Mitberichterstatter: Prof.Dr.med. H.-B. Hadorn

Dekan: Prof.Dr.med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 03.10.1985

Meiner Frau

Herrn Prof.Dr.med. W. Endres
danke ich herzlich für die Überlassung des Themas

Frau Dr.rer.nat. Yoon S. Shin
gilt mein besonderer Dank für die freundliche Unterstützung
bei der Durchführung meiner Experimente.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. AUFGABENSTELLUNG	6
3. MATERIALIEN	7
3.1 Chemikalien	7
3.2 Geräte	9
3.3 Proben	10
3.3.1 Organgewebe (Leber, Muskel, Niere, Herz, Darm)	10
3.3.2 Kultivierte Fruchtwasserzellen	10
3.3.3 Leukozyten	11
3.3.4 Rattenleber	12
4. METHODEN - Teil I	13
4.1 Spectrophotometrische F1P-Aldolasenbestimmung	13
4.2 Spectrophotometrische F-1,6-biphosphat-Aldolasenbestimmung	13
4.3 Berechnungsformel der Aldolasenaktivität	14
4.4 Proteinbestimmung	15
5. METHODEN - Teil II	16
5.1 Synthese von ^{14}C -Fructose-1-phosphat aus ^{14}C -Fructose	16
5.1.1 Präparation der DEAE-Cellulose	16
5.1.2 Gewinnung von Fructokinase aus Rattenleber	16
5.1.3 Berechnungsformel für die Fructokinaseaktivität	18
5.1.4 Radioaktiver Enzymtest der Fructokinasepräparataktivität durch Synthese von ^{14}C -F1P aus ^{14}C -Fructose	18
5.1.5 Synthese von radioaktivem F-1-P	19
5.1.6 Aufbauskitze der Gradientenpumpvorrichtung	19
5.2 Auftrennung von radioaktiver Fructose und radioaktivem F-1-P	19
5.2.1 Nachweis von F-1-P im zweiten Gipfel	20
5.2.2 Nachweis von Fructose-1-phosphat	20
5.2.3 Entstehung von radioaktivem Glycerinaldehyd	21
5.2.4 Abtrennung des ^{14}C -markierten Glycerinaldehyds mit der Ionenaustauschsäulenchromatographie	22

5.3	Fructose-1-phosphataldolasemessung mit radiometrischer Methode	22
5.3.1	Berechnungsformel für die Aldolasenaktivität nach der radiometrischen Methode	23
6.	ERGEBNISSE	24
6.1	Ziel	24
6.2	Aktivität und Kinetik der Fructose-1-phosphat- aldolase	26
6.2.1	Aldolasenaktivität bei Gesunden und HFI-Patienten	26
6.2.2	Bestimmung der Michaelis-Konstante für F-1-P-Aldolase	28
6.2.3	Bestimmung der Fructosealdolaseaktivität mit radiometrischer und spectrophotometrischer Methode	29
6.3	Der Einfluß von Cystein auf die Aldolasen- aktivität bei HFI-Patienten	31
6.4	Änderung der F1P-Aldolasenaktivität bei Vorbehandlung der Proben bei 56°C	32
6.5	F1P-Aldolasenaktivität in Leukozyten, kultivierten Fibroblasten und Amnionzellen	34
7.	DISKUSSION	35
8.	ZUSAMMENFASSUNG	40
9.	ABKÜRZUNGEN	41
10.	LITERATURVERZEICHNIS	42
11.	LEBENS LAUF	47

1. EINLEITUNG

Die hereditäre Fructoseintoleranz (HFI) wurde im Jahre 1956 von Chambers und Pratt (2) als eine bis dahin unbekannte Krankheit beschrieben. Bei den von ihnen beobachteten Patienten kam es nach Einnahme von Fructose und Saccharose zu abdominellen Beschwerden wie Erbrechen und Diarrhoe. Der Glucose-Toleranz-Test war normal. Sie vermuteten eine neue erbliche Anomalie im Stoffwechsel der Kohlenhydrate. 1957 beschrieben Froesch et al. bei vier miteinander verwandten Patienten diese neue Stoffwechselerkrankung als eine autosomal rezessiv vererbte Störung des Fructosestoffwechsels (5). Die akuten Symptome wie Übelkeit, Zittern und Bewußtseinstrübung, Zeichen der Hypoglykämie, traten bei Säuglingen kurz nach der Fructoseeinnahme auf. Nach Abklingen der akuten Symptome wurden ein transitorischer leichter Icterus und Albuminurie beobachtet. Sie nahmen an, daß die Störung auf dem Ausfall eines Enzyms, das für den Abbau der Fructose über Fructose-1-phosphat, Glycerinaldehyd und Dihydroxyaceton-phosphat notwendig ist, beruht.

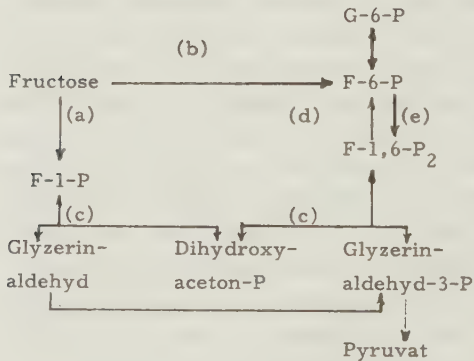
1963 beobachteten Froesch et al., daß keine bleibenden organischen Schäden bei den Patienten, die eine strenge Abneigung gegen fructosehaltige Nahrungsmittel entwickelt haben, aufgetreten sind (6). Auffallend war, daß die Zähne der HFI-Patienten frei von Karies waren. Dieselbe Beobachtung machten Köhlin und Melin (12) bei sieben erwachsenen HFI-Trägern. Alle waren psychisch und physisch normal entwickelt.

Froesch et al. (5) erstellten die Hypothese, daß der primäre Defekt auf der Abwesenheit der Fructose-1-phosphat-spaltenden Aldolase in der Leber dieser Patienten beruht. Bei ihren Untersuchungen stellten sie fest, daß das Lebergewebe dieser Patienten die Fructose im Umfang von 2 - 4 % der Norm metabolisiert (6). Die deutliche Reduktion der Aldolasenaktivität wurde auch von Hers und Joassin 1961 (11) und von Nikkilä et al. 1962 beobachtet (17). Die Enzymaktivität im Skelettmuskel war normal. Die Aktivität der F-1,6-bisphosphatase war sechsmal so stark wie die der Fructaldolase (11). Die nach Fructosebelastung auftre-

tende Hypoglykämie wurde als sekundärer Block im Glucose-Abbau der Leber gedeutet (4, 7, 11, 25).

Schon 1961 und 1963 erkannten Rutter et al. (19, 24), daß es verschiedene Formen der Aldolase gibt. Es wird Muskelaldolase (Aldolase A) von der Leberaldolase B unterschieden. Sie haben eine unterschiedliche Primärstruktur. Die Differenz zwischen beiden Aldolasen erklärt sich durch unterschiedliche Genomregionen, die für die Synthese des Enzyms bestimmend sind.

1966 isolierten Penhoet et al. (19) aus Kaninchenhirn eine neue Aldolase, Aldolase C, die durch ihre katalytischen, immunochemischen und elektrophoretischen Eigenschaften von Aldolase A und Aldolase B unterschieden werden kann. Die Fructose wird über zwei verschiedene Wege metabolisiert (1). Der größte Teil wird in der Leber verstoffwechselt.



(a) Fructokinase

(d) F-1,6-biphosphatase

(b) Hexokinase

(e) F-6-P Fructokinase

(c) Fructoaldolase

Die Fructose wird durch die Fructokinase in der Leber sehr schnell zu F-1-P phosphoryliert. An dieser Reaktion ist ATP beteiligt. Ein kleiner Teil der Fructose passiert die Leber und wird zu anderen Organen, wie Muskel und Fettgewebe, transportiert, wo sie zu Fructose-6-phosphat metabolisiert wird. In Niere und Darm wird die Fructose auf die gleiche Weise wie in der Leber, nämlich über F-1-P, metabolisiert. Die Kapazität der beiden Organe ist viel geringer als die der Leber (33). Fructose-1-phosphat wird in Leber, Niere und Darm durch Aldolase B in Dihydroxyacetonphosphat und Glycerinaldehyd gespalten. Diese Reaktion ist reversibel (41). Das entstandene DHAP mündet in die Glykolyse ein. Das Glycerinaldehyd kann drei verschiedene Wege gehen:

1. Phosphorylierung zu Glycerinaldehyd-3-phosphat
ATP liefert in diese Reaktion die Phosphatgruppe;
2. Oxydation zu Glycerinsäure;
3. Reduktion zum Glycerin.

Die erste von diesen Reaktionen ist der Hauptweg für die Verstoffwechselung von Glycerinaldehyd.

Fructaldolase spaltet auch FDP in zwei Triosen, in Glycerinaldehydphosphat und DHAP (1). 1957 gelang es Kaletta-Gmünder et al. durch chromatographische Trennung vorfraktionierter Extrakte aus Rattenleber das Vorhandensein zweier verschiedener Aldolasen nachzuweisen (13). Sie stellten einen Unterschied in ihrer Aktivität gegenüber den beiden Substraten F-1-P und FDP fest.

1968 berichteten Nordmann et al. (18) über einen bei HFI-Patienten unterschiedlichen Aktivitätsabfall der Leberaldolasen gegenüber beiden Substraten. Die Aktivität zu F-1-P fällt auf 3 % der Norm und die zu FDP auf 15 - 20 %. Der Aktivitätsquotient der Leberaldolasen zu beiden Substraten, der normalerweise 1 beträgt, ist bei der HFI auf 6 gestiegen (FDP/F-1-P). 1975 konnte Schapira (26) diese Ergebnisse bestätigen. Er fand heraus, daß der Aktivitätsquotient FDP/F-1-P bei HFI für Leberaldolasen zwischen 2,5 und

15 liegt, für Aldolase A über 50 und für Aldolase C bei ca. 7. Die Michaeliskonstante, als Ausdruck der Affinität der Aldolase B zu F-1-P, die normal ca. 4 mM beträgt, ist auf 15 - 30 mM angestiegen.

1974 untersuchten Gitzelmann et al. (8) die Leberaldolasen auf ihre elektrophoretische Beweglichkeit und thermische Stabilität. Dabei kam heraus, daß die elektrophoretische Mobilität bei HFI und Normalleber sehr ähnlich und die thermische Stabilität sehr stark reduziert war.

Die obigen Autoren (8, 26) versuchten die alterierte Leberaldolase B mit Antiserum zu inkubieren. Dabei stellten sie fest, daß die katalytische Aktivität der Aldolase B nicht unbedingt irreversibel ist, weil sie in einigen Fällen einen Aktivitätszuwachs von 25 % erreichten.

Steinman und Richards (35) zeigten, daß die K_m für F-1-P und FDP signifikant ansteigt, wenn man zwei SH-Gruppen durch Zusatz von Disulphid-monosulphoxid-Reagenz ändert. Sie vermuteten den primären Defekt in den Thiolgruppen, der die Enzymaffinität zum Substrat vermindert. Wir konnten auch eine signifikante Änderung der Aldolasenaktivität durch Zusatz von Cystein in unseren Versuchen erreichen.

Rensing et al. (21) untersuchten die Veränderungen der Aldolase-Isoenzymmuster und der Aktivitäten gegenüber FDP und F-1-P in Organextrakten der Ratte während der Entwicklung vom foetalen zum adulten Tier. Dabei stellten sie fest, daß die Differenzierung in Leber, Niere und Gehirn von einer einheitlichen Aldolase in Richtung auf B oder C erfolgt. Aktivitätsverhältnisse, die den adulten entsprechen, bilden sich in der Leber zur Zeit der Geburt. In Niere und Gehirn erfolgt die Bildung erst später und im Hoden bildet sich das adulte Enzymmuster erst während der Pubertät aus. Obwohl die Hodenaldolasen elektrophoretisch A-C-Hybriden gleichen, findet sich kein reines Enzym C. In Herz, Quadrizepsmuskulatur und Lunge waren Veränderungen des Isoenzymmusters nicht nachweisbar.

Verschiedene andere Autoren (20, 37, 38) untersuchten die Zelldifferenzierung während der foetalen Entwicklung an Extrakten aus Niere und Dünndarm und konnten immunhistochemisch den ontogenetischen Wechsel des Aldolasemusters nachweisen. Innerhalb dieser Zellen findet während der Entwicklung eine Zunahme der Konzentration von B und eine Abnahme der von A statt. Mit der Methode "mixed aggregation immuno-cytochemical technique" (MAGIC) (39), konnte der Nachweis der Isoenzyme in den einzelnen Zellen erbracht werden.

1981 gelang es Tsutsumi und Ishikawa (36) aus foetalem und adultem Lebergewebe mRNA zu isolieren und so die Aldolase B zu synthetisieren.

1982 (10) konnte die Korrelation zwischen Boten-RNS und Leberaldolase gezeigt werden. Die Aldolase-B-Boten-RNS-Aktivität in adulter Leber beträgt 1,3 % der Gesamtaktivität, 0,1 % in der Leber bei sechs Monate alten Foeten und 0,01 % in der Leber 4,5 Monate alter Foeten.

2. AUFGABENSTELLUNG

Ziel dieser Arbeit war die Weiterentwicklung einer neuen radiometrischen Methode für die Aldolase B-Bestimmung (32), um die Diagnostik der HFI zu erleichtern. Durch diese Methode, die sehr einfach ist, sollte eine genauere Betrachtung der Aldolasen-aktivitätsunterschiede möglich sein. Die neue radiometrische Methode ermöglicht es, eine viel größere Anzahl von Proben bei geringerem Zeitaufwand zu bewältigen. Für die F-1-P-Aldolasenbestimmung mit Hilfe dieser Methode braucht man um ein Vielfaches weniger Gewebe als bei der photometrischen Methode nach Gitzelmann.

Grundlage der radiometrischen Methode war die Herstellung radioaktiver F1P und mit Hilfe der Säulenchromatographie die Trennung der Reaktionsprodukte F1P, Glycerinaldehyd und Dihydroxyacetonphosphat.

Die Aldolase-B-Aktivität und die kinetischen Eigenschaften wurden von uns in Leber, Muskel, Niere, Darm und Herz untersucht. Wir führten Untersuchungen durch, um Veränderungen der Isoenzymmuster der Aldolasen während der fetalen Entwicklung an menschlicher Niere und Dünndarm zu erfassen. Wir stellten Untersuchungen an, um die Veränderungen der Affinität während der fetalen Reifung zu bestimmen. Mit diesem Ziel untersuchten wir die thermische Stabilität der Aldolasen und den Einfluß von Cystein auf die Aktivitätsveränderungen.

Wir stellten Untersuchungen im Hinblick auf die Differenzierungsmöglichkeiten zwischen HFI-Trägern und gesunden Personen in Leukozyten, gezüchteten Fibroblasten und Amnionzellen an.

3. MATERIALIEN

3.1 Chemikalien

Teil I

- Triäthanolamin reinst $C_6H_{15}NO_3$
Firma Merck, Darmstadt
- Nicotinamid-adenin-dinucleotid $C_{21}H_{27}N_7O_{14}P_2Na_2H_2O$
Firma Boehringer Mannheim GmbH
- Fructose-1-phosphat $C_6H_{11}O_9PNa_2$
Firma Boehringer Mannheim GmbH
- Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase
Firma Boehringer Mannheim GmbH
- Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase, Triosephosphat-Isomerase,
Firma Boehringer Mannheim GmbH
- Fructose-1,6-Diphosphat $C_6H_{11}O_{12}P_2Na_3 \cdot 8H_2O$
Firma Sigma Chemical Company, München
- Natriumdihydrogencarbonat Na_2CO_3
Firma Sigma Chemical Company, München
- Natriumchlorid krist.
Firma Merck, Darmstadt
- Essigsäure CH_3COOH
Firma Merck, Darmstadt
- Kupfer (II)-sulfat $CuSO_4$
Firma Merck, Darmstadt
- Kaliumchlorid reinst.
Firma Merck, Darmstadt
- Kaliumnatriumtartrat $C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$
Firma Merck, Darmstadt
- Kaliumdihydrogenphosphat KH_2PO_4
Firma Merck, Darmstadt
- Di-Kaliumhydrogenphosphat-3-hydrat $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$
Firma Merck, Darmstadt

- Folin-Ciocalteus Phenolreagenz
Firma Merck, Darmstadt
- Äthylendiamintetraessigsäure $C_{10}H_{12}N_2Na_4O_8 \cdot 2H_2O$
Firma Merck, Darmstadt

Teil II

- Aceton CH_3COOH_3
Firma Merck, Darmstadt
- di-Phosphorpentoxid P_2O_5
Firma Merck, Darmstadt
- Fructose $C_6H_{12}O_6$
Firma Merck, Darmstadt
- Magnesiumchlorid $MgCl_2 \cdot 6H_2O$
Firma Merck, Darmstadt
- Diäthylaminoäthyl-Cellulose
Firma Sigma Chemical Company, München
- radioaktive Fructose D-($U^{14}C$)-Fructose, 250 μ Ci
Firma Amersham Buchler GmbH & Co.KG, Braunschweig
- Adenosin-5'-Triphosphat $C_{10}H_{14}N_5O_{13}P_3Na_2 \cdot 3H_2O$
Firma Boehringer Mannheim GmbH
- Resorcin $C_6H_6O_2$
Firma Merck, Darmstadt
- Thioharnstoff H_2NCSNH_2
Firma Merck, Darmstadt
- Ammoniumsulfat $(NH_4)_2SO_4$
Firma Merck, Darmstadt
- Quickszint 402
Firma Zinsser Analytic GmbH
- L-Cystein, $C_3H_7NO_2S$
Firma Merck, Darmstadt

3.2 Geräte

Teil I

- Eppendorf-Photometer M1167671
- Eppendorf-Rotationsmischer, Nr. 3300
- Eppendorf-Zentrifuge
- Eppendorfgefäße
- Sonifier B-10 Cell disruptor
Branson Sonic power company, Danbury, Connecticut
- Präzisionsküvetten aus optischem Spezialglas der
Firma Hellma, Typ-nr. 105-OS, Schichttiefe 10.0 mm
- Heizblock 37°C, 56°C, 95°C
- Gefrierschrank Linde, Temperatur -20°C
- Pipetten
- Einmalküvette

Teil II

- Counter, Searle Analytic Inc. Delta 300,
6890 Liquid Scintillation System
- Micro-Schlauchpumpe
Firma Desaga, Heidelberg
- große Säule $\phi 9$ mm, 15 cm hoch
- Eppendorf-Säulenständer
- Fraktionssammler, Microcol TDC 80
Firma Gilson

3.3 Proben

3.3.1 Gewebe für Untersuchungszwecke wurde aus Leber, Muskel, Niere, Herz und Darm von Feten und Erwachsenen gewonnen.

Dieses Autopsie- und Biopsiematerial von Erwachsenen wurde entweder sofort verwendet oder bei -20°C aufbewahrt. Die Gewebeproben, die bei -20°C aufbewahrt wurden, wurden zur Verarbeitung langsam auf Zimmertemperatur erwärmt.

Das Gewebe von Feten wurde von Spontanaborten und legalen Schwangerschaftsabbrüchen für diagnostische Zwecke entnommen. Die Proben aus Leber, Niere, Darm, Muskel und Herzen der Feten wurden entweder gleich verarbeitet, oder bei -20°C aufbewahrt und zur Verarbeitung langsam auf Zimmertemperatur erwärmt.

Bevor das Gewebe von Feten und Biopsie- und Autopsiematerial der Erwachsenen untersucht wurde, wurde es im Sonifier kurz homogenisiert und anschließend dialysiert. Die Enzymaktivität blieb annähernd konstant bei den Proben, die dialysiert und bei -20°C aufbewahrt wurden.

3.3.2 Kultivierte Fruchtwasserzellen

Ich erhielt Amnionzellen und Fibroblasten für Untersuchungszwecke in den Flaschen, die das Nährmedium noch enthielten.

Das Nährmedium wird vorsichtig abgegossen und anschließend zweimal mit physiologischer Kochsalzlösung gespült, um die "toten" Zellen zu entfernen. Dann fügt man wieder ca. 3 ml physiologischer Kochsalzlösung hinzu und kratzt mit dem "Scraper", einem auf Draht aufgezogenen Silikonschlauch, den einschichtigen Zellrasen vom Flaschenboden ab.

Das Zellen-Kochsalzlösungsgemisch gießt man in die Reagenzgläser. Dieser Vorgang wird dreimal wiederholt, so daß in jedem Reagenzglas ca. 9 ml Flüssigkeit, zusammen mit den Zellen, enthalten sind.

Dann wird das Ganze bei 1400 Upm für 15 Minuten zentrifugiert.

Der Überstand wird abgegossen, Kochsalzlösung dazugeben und erneut unter denselben Bedingungen zentrifugiert. Anschließend kippt man den Überstand wieder ab und füllt die Zellen mit ca. 100 µl Kochsalzlösung auf.

Bis zum Gebrauch werden sie bei -20°C aufbewahrt.

3.3.3 Leukozyten von gesunden Erwachsenen und HFI-Trägern

Die Leukozyten werden nach folgender Vorschrift behandelt:

Lösungen:

a) Leukolösung: 5,0 g Dextran
0,7 g NaCl auf 100 ml aqua bidest
50 mg Heparin.

b) 0,7 % NaCl

c) 0,1 % Essigsäure

Vorgehen:

In ein Reagenzglas, das mit 1 ml Leukolösung gefüllt ist, läßt man 5 ml Blut tropfen. Das Ganze wird vorsichtig durch Kippen gemischt. Anschließend läßt man es eine Stunde bei Raumtemperatur sedimentieren. Danach wird der Überstand abgehoben und 15 Minuten lang bei 1500 Upm zentrifugiert. Leukosediment mit 0,150 ml 0,1 % Essigsäure 15-30 Sekunden schütteln, um die Erythrozyten zu zerstören. Sofort mit 0,7 % NaCl auffüllen und bei 1500 Upm 15 Minuten lang zentrifugieren. Wenn zuviele Erythrozyten im Sediment sind, wird der Vorgang wiederholt. An-

schließlich wird das Sediment noch einmal mit 0,7 % NaCl gewaschen und das Leukosediment in ca. 500 µl aqua bidest. gelöst. Die so behandelten Leukozyten bewahrt man bei -20°C auf.

3.3.4 Tiefgefrorene Rattenleber wurde zur Gewinnung von Fructokinase verwendet.

Die Rattenleber wurde langsam bei Raumtemperatur aufgetaut. Dann wurde je 1 g Rattenleber in 20 ml 0,154 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,6, im Sonifier homogenisiert.

4. METHODEN - Teil I

4.1 Spectrophotometrische F1P-Aldolasenbestimmung: (modifiziert nach Gitzelmann (9))

Ansatz:

- Gesamtvolumen 280 μ l
- 15 Teile Triäthanolaminpuffer 50 mM, pH 7,6
- 2 Teile Glycerin-3-phosphat-dehydrogenase 5 mg/ml
- 10 Teile Probenlösung
- 1 Teil NADH 5 mg/ml

Die vier Lösungen werden im Eisbad in ein Eppendorfhütchen pipettiert und anschließend auf dem Rüttler durchmischt. Dann gibt man die gesamte Menge in die geschliffene Photometerküvette (Fassungsvermögen 0,3 ml). Die Meßreaktion wird mit 20 μ l Fructose-1-P, 1,5 M, pH 7,6 gestartet. Die Extinktion wird bei 334 nm (Mikroschlitz) bei 0 Minuten abgelesen.

Daraufhin liest man die Extinktionswerte bei 2, 4, 6 und 10 Minuten ab.

Als Leerwerte wird je 100 μ l aqua bidest. anstelle von Probenlösung verwendet.

Alle Messungen werden als Triplikate durchgeführt.

4.2 Spectrophotometrische Fructose-1,6-biphosphat-aldolasenbestimmung (modifiziert nach Gitzelmann (9))

Ansatz:

- Gesamtvolumen 280 μ l
- 15 Teile Triäthanolaminpuffer 50 mM, pH 7,6

2 Teile Glycerin-3-phosphat-dehydrogenase

(ca. 100 U/mg Protein)

Triosephosphatisomerase je 1 mg Protein/ml

(ca. 1000 U/mg Protein)

10 Teile Probe

1 Teil NADH 5 mg/ml

Das weitere Vorgehen entspricht dem der F-1-P-Aldolasenbestimmung.

Die Reaktion wird mit 20 µl Fructose-1,6-biphosphat gestartet.

Alle Messungen werden auch hier als Triplikate durchgeführt.

4.3 Berechnungsformel der Aldolasenaktivität:

(in µmol/min/mg Protein bzw. µmol/min/g Gewebe)

$$\frac{\Delta E \left[E_{(P)} - E_{(L)} \right] \times Vf}{6 \times I \times 0,3}$$

E = Extinktion

E_(P) = Extinktion der Probenlösung

E_(L) = Extinktion des Leerwertes

Vf = Verdünnungsfaktor der ursprünglichen Probenlösung pro g Gewebe bzw. mg Protein

I = Inkubationszeit in Minuten

0,3 = Küvettenkorrekturfaktor

$$\frac{\Delta E \left[E_{(P)} - E_{(L)} \right]}{6} = \mu\text{mol}$$

4.4 Proteinbestimmung

(modifiziert nach Lowry et al. (16))

Lösungen:

A = 2 % Na_2CO_3 in n/10 NaOH

B_a = 5,5 g CuSO_4 /100 ml

B_b = 1,35 g Seignettesalz/100 ml

Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz

2 % Na_2CO_3

Mischungen: (werden immer frisch angesetzt)

I = 0,2 ml B_b

0,02 ml B_a

0,22 ml B

II = 5,0 ml A

0,1 ml B

5,1 ml C

Standard:

Rinderserumalbumin 0,025, 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1,0 mg/ml

Vorgang:

20 µl Homogenat (zentrifugierter Überstand) gibt man in ein Eppendorfhütchen. Dazu werden 200 µl frisches Kupferreagenz C gegeben. Das Ganze mischt man gut durch und läßt es 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen.

Dann werden 20 µl Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz, verdünnt 1 : 2 mit 2 % Na_2CO_3 , hinzugefügt und durchmischt.

Das Ganze läßt man 30 bis 35 Minuten im Dunkeln stehen.

Anschließend wird das Gemisch in eine Mikroküvette pipettiert und die Extinktion (mit Mikroschlitz) bei 772 nm am Eppendorphotometer gegen Leerwert abgelesen.

Für den Leerwert wird der gleichbehandelte Ansatz mit aqua bidest. statt Homogenat verwendet. Aufstellung einer Standardkurve mit den Rinderserumalbuminwerten von 0,0 bis 1,0 mg/ml. Die Proteinwerte der Probenlösungen werden anhand der Standardkurve bestimmt.

5. METHODEN - Teil II

5.1 Synthese von ^{14}C -Fructose-1-phosphat aus ^{14}C -Fructose

5.1.1 Präparation der DEAE-Cellulose

Man löst ca. 200 g trockenes Pulver mit destilliertem Wasser auf.

Bei der anschließenden Sedimentation sinken die feinen Partikel und können abgesaugt werden. Dann wird das Sediment dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen und 1 N NaOH dazugegeben.

Das Ganze läßt man 30 Minuten rühren.

Um den pH-Wert von 7,0 zu erreichen, wird das Sediment wieder mit destilliertem Wasser gewaschen.

So wird DEAE-Cellulose, OH-Form, gewonnen.

Um die DEAE-Cellulose, Cl-Form, herzustellen, fügt man zu präparierter DEAE-Cellulose, OH-Form, 0,15 N HCl hinzu und rührt eine Stunde. Nach der anschließenden Sedimentation wird das Sediment mit destilliertem Wasser gewaschen, bis pH 7,0 erreicht ist.

Die so hergestellte DEAE-Cellulose, Cl-Form, wird aufbewahrt.

5.1.2 Gewinnung von Fructokinase aus Rattenleber

(nach Staub und Vestling (34))

I. Fraktion:

1 g Rattenleber wird in 20 ml 0,154 M Kaliumphosphatpuffer homogenisiert.

II. Fraktion:

5 g Rattenleber werden für eine Minute in 150 ml eiskaltem Aceton homogenisiert und anschließend zur Entfernung des

Acetons mit Saugvakuum filtriert. Der Überstand wird zerkleinert und über Vakuum mit P_2O_5 getrocknet.

Das getrocknete Pulver verwendet man zur weiteren Enzymextraktion. Pro Gramm trockenes Pulver werden 20 ml eiskalten Kaliumphosphatpuffer 0,154 M, pH 7,6 hinzugefügt.

Diese Lösung 30 Minuten stehenlassen; anschließend bei 2000 Upm 10 Minuten lang bei 0°C zentrifugieren.

III. Fraktion:

Die Hälfte des Extraktes aus Fraktion II werden für zwei Minuten in ein Wasserbad von 70°C gegeben und danach sofort im Eisbad gekühlt.

Anschließend zentrifugiert man den Extrakt bei 0°C und 4800 Upm 25 Minuten lang.

IV/1. Fraktion:

3/4 des Überstandes aus Fraktion II werden in einen Trichter gefüllt und eingefroren.

Der eingefrorene Trichterinhalt wird später bei Zimmertemperatur aufgetaut, wobei sich ein rot gefärbter Teil der Lösung auf dem Trichtergrund absetzt. Diesen Teil läßt man in ein Reagenzglas ablaufen.

IV/2. Fraktion:

Trichterinhalt einfrieren und nach dem Auftauen den unteren Teil ablaufen lassen.

V. Fraktion:

Rest im Trichter, der etwa 90 % der Enzymaktivität enthalten soll.

5.1.3 Berechnungsformel für die Fructokinaseaktivität (in $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ Protein)

$$\frac{\text{Counts/min in HCl-Fraktion} - L}{\text{Gesamtaktivität (Counts/min)}} \times C_{\text{Fru.}} \times \frac{1}{I} \times \frac{1}{\text{mg Pr/ml}}$$

L = Leerwert

C_{Fru} = Endkonzentration der Fructose in mM

I = Inkubationszeit in Minuten

mg Pr/ml = mg Protein / ml der Fructokinasefraktion

5.1.4 Radioaktiver Enzymtest der Fructokinasepräparataktivität durch Synthese von ^{14}C -F1P aus ^{14}C -Fructose

Reaktionsgemisch:

0,05 mol/L Kaliumphosphatpuffer pH 7,6

30 $\mu\text{mol}/\text{L}$ MgCl_2

10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ATP

^{14}C -Fructose (250 μCi , 1 μmol)

0,1 U Fructokinase

Gesamtvolumen 3 ml

Dieses Reaktionsgemisch wird auf dem Rüttler gemischt und dann bei 37°C eine Stunde inkubiert. Anschließend wird die Reaktion bei 95°C , 3 Minuten gestoppt.

Das Inkubationsgemisch gibt man dann auf eine mit DEAE-Cellulose, OH-Form, gepackte Säule (0,9 x 15 cm). Dann wird Kaliumphosphatpuffer, graduiert von 0,01 - 0,3 mol/l, pH 7,6 hinzugefügt.

Im Anschluß daran werden 1 ml-Fractionen mit Hilfe eines Tropfenzählers gesammelt.

Je 50 μl dieser Fractionen werden in ein Vial, ein Schraubgefäß, gegeben und mit 6 ml Quickszint gemischt.

Im Counter wird dann die Radioaktivität für zwei Minuten gezählt.

5.1.5 Synthese von radioaktivem F-1-P

Die Methode ist unter 5.1.4 beschrieben.

Zur Reinigung und Isolierung von ^{14}C -F1P wurde ein geschlossenes System einer Gradienten-Pumpvorrichtung entwickelt. Durch diese Pumpvorrichtung wird Kaliumphosphatpuffer, graduiert von 0,01 - 0,3 mol/l, pH 7,6, kontinuierlich auf eine mit DEAE-Cellulose, OH-Form, gepackte Säule gegeben.

5.1.6 Aufbau der Gradientenpumpe

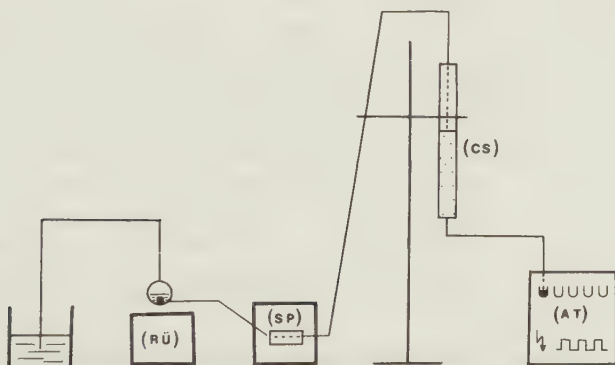


Abb. 1. Schematische Darstellung der Gradientenpumpe.

RÜ = Rührer; SP = Schlauchpumpe; CS = DEAE-Cellulose, OH-Form; AT = Automatischer Tropfzähler.

5.2 Auftrennung von radioaktiver Fructose und radioaktivem F-1-P

Die Trennung von ^{14}C -Fructose und ^{14}C -Fructose-1-phosphat erfolgt aufgrund ihrer unterschiedlichen negativen Ladungen. Es findet nacheinander die Elution von radioaktiver Fructose und radioaktivem F1P statt (Abb. 2).



Abb. 2. Säulenchromatographische Trennung von ^{14}C -Fructose (1. Gipfel) und ^{14}C -F1P (2. Gipfel). Die CPM-Werte wurden auf der Ordinate gegen die fortlaufenden Fraktionsnummern auf der Abszisse aufgetragen.

5.2.1. Nachweis von F-1-P im zweiten Gipfel:

Der erste Gipfel in Abb. 2 beinhaltet die radioaktive Fructose und der zweite die F-1-P-Fraktion.

Das F-1-P wird mit der Methode von Roe et al. (22) nachgewiesen. So konnten wir feststellen, daß der zweite Gipfel die F-1-P-Fraktion darstellt. Die Fraktionen des zweiten Gipfels werden gesammelt und zur Aktivitätsbestimmung der Aldolasen verwendet.

5.2.2 Nachweis von Fructose-1-phosphat: (nach Roe et al. (22))

Ansatz:

- 0,2 ml aqua bidest.
- 10 µl F1P bzw. Probe
- 100 µl Farbentwickler:
 - 10 ml Essigsäure konz.
 - 10 mg Resorcin
 - 25 mg Thioharnstoff
- 700 µl Salzsäure konz.

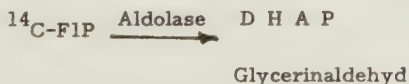
Das Gemisch wird 10 Minuten im Wasserbad bei 80°C gelassen, anschließend gekühlt.

30 Minuten nach Beginn des Erhitzens wird bei 492 nm im Eppendorffphotometer die Extinktion gemessen.

Aus bekannten F1P-Konzentrationen wird eine Eichkurve hergestellt und mit Hilfe dieser die F1P-Konzentration der Proben abgelesen.

5.2.3 Entstehung von radioaktivem Glycerinaldehyd:

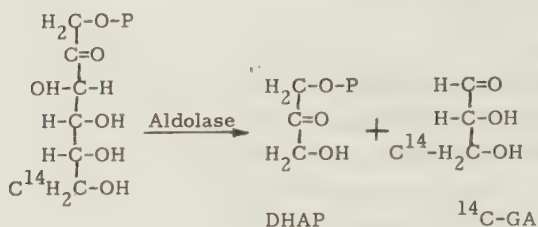
Durch die radioaktive Markierung von Glycerinaldehyd in der Reaktion



haben wir eine ideale Möglichkeit, die Menge an entstandenem Glycerinaldehyd zu bestimmen.

Die ${}^{14}\text{C}$ -Fructose ist am Kohlenstoffatom Nr. 6 radioaktiv markiert. Somit bekommen wir eine an C_6 radioaktiv markierte F-1-P.

Die Reaktion des radioaktiven F1P mit der Aldolase



bringt uns als Reaktionsprodukt radioaktiven Glycerinaldehyd, Dihydroxyacetonphosphat ist nicht radioaktiv markiert.

5.2.4 Abtrennung des ^{14}C -markierten Glycerinaldehyds mit der Ionenaustauschsäulenchromatographie:

Mit der Microsäulenchromatographie nach Shin-Buehring (31) kann man Glycerinaldehyd von Dihydroxyacetonphosphat und ^{14}C -F1P trennen. Die Menge an entstandenem Glycerinaldehyd kann exakt bestimmt werden und dient als Maß für die vorhandene Aldolasenaktivität. Siehe dazu 5.3 und 5.3.1.

Die Aldolasenaktivität wird in nmol Glycerinaldehyd pro Minute und mg Protein angegeben.

Protein wird nach der Methode von Lowry et al. (16) bestimmt.

5.2 Fructose-1-phosphataldolasenmessung mit radiometrischer Methode.

Ansatz:

1 Teil Gemisch:	50 μl ^{14}C -F1P
	600 μl kalte F-1-P
1 Teil Probenlösung	

Vorgang:

60 µl Gemisch und 60 µl Probenlösung werden in ein Eppendorfhütchen pipettiert, kurz gerüttelt, und für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird bei 95°C fünf Minuten lang gestoppt.

Anschließend zentrifugiert man die Lösung.

100 µl von dem so behandelten Ansatz werden auf die gepackten Säulen gegeben.

Die 2-ml-Säulen werden mit DEAE-Cellulose, Cl-Form, 1 cm hoch gepackt und mit 2 x 3 ml H₂O eluiert.

Die eluierte Flüssigkeit füllt man pro Vial mit jeweils 18 ml Szintillationsflüssigkeit auf.

Das Ganze wird gut geschüttelt und die Radioaktivität im Counter gezählt.

Die Messung erfolgt durch Radioaktivitätszählung, mit Hilfe der Ionenaustauschsäulenchromatographie nach Shin-Buehring et al. (31).

Die Proteinmenge in der Probenlösung wird nach der Methode von Lowry et al. (16) bestimmt und liegt zwischen 1 und 10 µg.

Die Aldolasenaktivität ist in nmol Glycerinaldehyd pro Minute und pro mg Protein zu messen.

5.3.1 Berechnungsformel für die Aldolasenaktivität nach der radiometrischen Methode

(in nmol Glycerinaldehyd/min/mg Protein)

$$\frac{\text{CPM} - \text{Leerwert}}{\text{Gesamtaktivität}} \times {}^{14}\text{C-F1P} \frac{1}{P} \times \frac{1}{Iz} \times \text{M-F1P} \frac{1}{Mp} \times V_f$$

${}^{14}\text{C-F1P}$ = Endkonzentration des radioaktiven F1P in nmol

P = mg Protein pro ml der Probenlösung

Iz = Inkubationszeit in Minuten

M-F1P = Menge des radioaktiven F1P

Mp = Menge der Probenlösung

Vf = Verdünnungsfaktor der Probenlösung

6. ERGEBNISSE

6.1 Ziel

Ziel dieser Arbeit war es, die F-1-P-Aldolaseaktivität in Biopsie- und Autopsieproben von gesunden Erwachsenen und HFI-Patienten mit der neuen Methode zu bestimmen. Die Aldolasenaktivität wurde in den Proben aus Leber, Niere, Darm, Herz und Muskel gemessen.

Weiterhin haben wir Untersuchungen an Fibroblasten, Amnionzellen und Leukozyten durchgeführt, um über eine Aldolasenaktivitätsbestimmung in diesen Zellen zu prüfen, ob eine pränatale Diagnose der HFI aus Amnionzellen sowie eine postnatale Diagnose aus Leukozyten und Fibroblasten möglich ist.

Die Grundlage der neuen radiometrischen Methode ist die Spaltung des Fructose-1-phosphats in Dihydroxyaceton-P und Glycerinaldehyd. Diese Reaktion wird von F-1-P-Aldolase katalysiert. Diese Aldolase ist in Leber, Niere und Darm vorhanden. Je mehr funktionstüchtige Aldolase pro mg Protein der untersuchten Gewebeproben aus o.g. Organen vorhanden ist, umso mehr Reaktionsprodukte an DHAP und GA, bei einem Überschuß an F-1-P, werden entstehen. Die beiden Triosen stehen im Gleichgewicht (14). Die Menge an gebildetem Glycerinaldehyd kann als Maß für die F1P-Aldolasenaktivität genommen werden.

Diese beiden Triosen kann man in der Ionenaustausch-säulenchromatographie nach Shin-Buehring (31) trennen. Dies ist deswegen möglich, weil DHAP und GA unterschiedliche Ladungen haben: DHAP hat wegen seines Phosphatanteils negative Ladung und Glycerinaldehyd ist neutral. Da die F-1-P auch negative Ladung wie DHAP hat, findet man den nicht verstoffwechselten F1P-Teil in derselben Elutionsfraktion, in der sich DHAP befindet.

Um diese Untersuchungen durchführen zu können, mußten wir radioaktive F1P selbst herstellen. Es gab mehrere

Gründe, die uns dazu bewogen haben: erstens ist die radioaktive F1P im Handel nicht erhältlich und zweitens würde die Sonderherstellung dergleichen zu viel kosten.

Da die radioaktive Fructose im Handel erhältlich ist, stellten wir radioaktive F-1-P selbst her.

Fructokinase gewannen wir aus Rattenleber; nach einer Vorschrift von Staub und Vestling (34). Siehe dazu 5.1.2. Die Fructokinasepräparataktivität wird durch die Synthese von ^{14}C -F1P aus ^{14}C -Fructose getestet. Die dabei verwendete Meßmethode wurde unter 5.1.3 und 5.1.4 dargestellt.

Fructose reagiert in Anwesenheit von Fructokinase und ATP zu F-1-P (1, 41).



Die radioaktive Fructose reagiert genauso wie die nicht ^{14}C -markierte Fructose. Als Reaktionsprodukt entsteht radioaktive Fructose und AMP.

6.2 Aktivität und Kinetik der Fructose-1-phosphat-aldolase

6.2.1 Aldolasenaktivität bei Gesunden und HFI-Patienten

Die Differenz in der Aldolasenaktivität zwischen der Norm und HFI ist größer bei der niedrigen Konzentration der F-1-P (Abb. 3). Deswegen empfiehlt es sich, die FlP- Konzentration von annähernd 0,5 mmol/l zu verwenden.

Bei der FlP-Endkonzentration von 10 mmol/l war die Enzymaktivität in Normalleber höher als 60 nmol/min/mg Protein und bei HFI größer als 15 nmol/min/mg Protein.

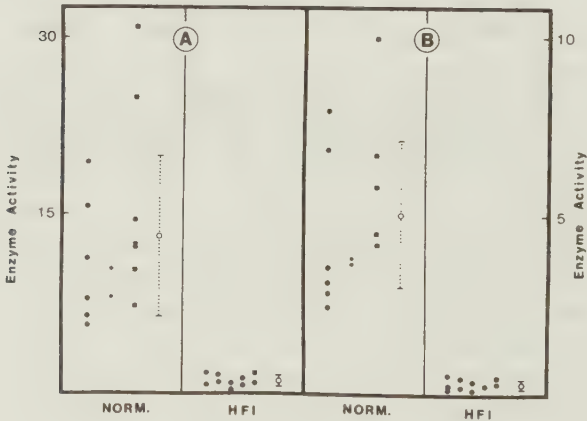


Abb. 3. Verteilung der Aldolasenaktivität (nmol/min/mg Protein) bei Gesunden und HFI-Patienten. A, mit 1.2 mmol/l F-1-P im Reaktionsgemisch; B, mit 0.33 mmol/l F-1-P im Reaktionsgemisch.

● Leber, * Niere, ■ Darm, ○ Mittelwert, — Standardabweichung

Man beachte die unterschiedlichen Ordinaten!

Wie aus der Abbildung 4 zu sehen ist, zeigt das Leber- und Darmgewebe von HFI-Patienten eine deutlich niedrigere Affinität zum Substrat (Substrat = F1P) als dasjenige von gesunden Kontrollen. Außerdem hat das Lineweaver-Burk-Diagramm für Aldolase B bei HFI-Patienten eine hyperbolische Form, was für einen Substrataktivierungseffekt spricht.

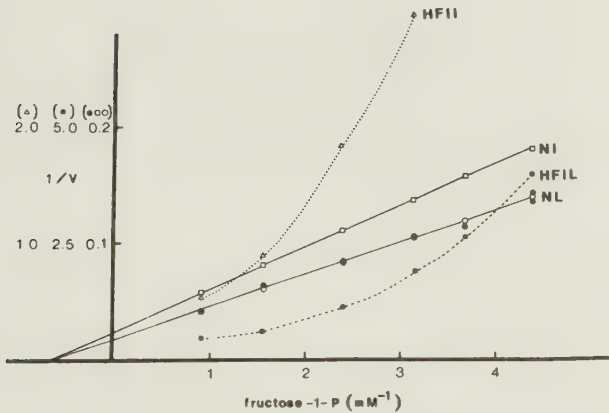


Abb. 4: Lineweaver-Burk-Diagramm der Fructosealdolase für Fructose-1-phosphat (mmol/l) in menschlichem Gewebe. □ Darm eines Erwachsenen (41 J., Autopsie), ● Leber eines Säuglings (3 Mo., Biopsie), Δ Darm eines HFI-Patienten (2 Mo., Biopsie), ● Leber (20 J., Biopsie), ■ Leber eines HFI-Patienten (2 Mo., Biopsie)

6.2.2 Bestimmung der Michaelis-Konstante für F-1-P-Aldolase

Die Michaelis-Konstante, als Ausdruck der Affinität der Aldolase zu F1P als Substrat, wurde in den Organen Leber, Muskel, Niere, Darm und Herz bestimmt (s. Tab. 1.). Die K_m -Werte bewegten sich bei Gesunden in der Leber von 1.0 - 2.0 mM, im Muskel von 2.66 - 5.5 mM, im Darm von 1.16 - 2.22 mM und in der Niere lagen sie bei 1.4 - 1.7 mM. Auffallend waren die Werte bei den Feten für Leber: 8 - 10 mM.

Die Michaelis-Konstante bei HFI-Patienten war sowohl in der Leber als auch im Darm deutlich erhöht. Hier zeigte sich eine sehr geringe Affinität der Aldolase zu F1P. Im Gegensatz zu normalen Probanden hat das Lineweaver-Burk-Diagramm bei HFI-Patienten eine hyperbolische Form (siehe Abb. 4).

Tabelle 1: Michaelis-Konstanten für FIP-Aldolase

Probe	Km-Werte in mM
Leber (N = 6)	1.50 $\pm$ 0.35 ¹ (1.0 - 2.0) ²
Leber (Fetus)	8 - 10
Darm	1.48 $\pm$ 0.37 (1.16 - 2.22)
Niere	1.4, 1.7
Muskel	2.66, 5.5
Herz	4.76
<u>HFI</u>	
Leber 1	50 ⁺
Leber 2	"
Leber 3	"
Leber 4	"
Leber 5	"
Leber 6	"
Leber 7	"
Darm 1	"

¹ = Mittelwert $\pm$ Standardabweichung

² = Bereich

⁺ = Hyperbolische Form des Lineweaver-Burk-Diagramms

6.2.3 Bestimmung der Fructosealdolaseaktivität mit radiometrischer und spectrophotometrischer Methode

Wir haben die Fructosealdolaseaktivität in verschiedenen Gewebeproben von Gesunden und HFI-Patienten mit beiden Methoden gemessen (Tabelle 2).

Tabelle 2: Fructose-1-phosphat-Aldolasenaktivität in menschlichem Gewebe

Probe	N	Radiometrische Methode	Spectrophotometrische Methode, FBP/F1P
Leber (Adult)	6	4.46 ± 2.17^1 (2.24 - 10.0) ²	7.6 ± 2.4 (3.7 - 11.2) 0.8 - 2.0
Leber (Fetus)	2	1.30, 2.0	
Niere	2	3.6, 3.8	
Darm	5	6.24 ± 2.08 (4.2 - 10.0)	(3.7 - 15.7) 1.2 - 2.2

HFI

Leber 1	0.26	Ø	∞
Leber 2	0.36	3.0 ³	0.75
Leber 3	0.31	Ø	∞
Leber 4	0.20	Ø	∞
Leber 5	0.11	Ø	∞
Leber 6	0.13	Ø	∞
Leber 7	0.26	Ø	∞
Darm 1	0.50	1.84	2.5

¹ = Mittelwert $\pm$ Standardabweichung in nmol/min/mg Protein

² = Bereich

³ = Der Enzymtest mittels spectrophotometrischer Methode wurde nach der Diagnosestellung mit Hilfe der radio-metrischen Methode wiederholt.

Die F1P-Aldolasenaktivität war diesmal mit 0.2 nmol/min/mg Protein deutlich erniedrigt und der Quotient FBP/F1P lag mit 2.8 an der oberen Normgrenze.

Die Endkonzentration der F1P bei der radiometrischen Methode war 0.33 mmol/l und bei der spectrophotometrischen 30 mmol/l.

Die mit der spectrophotometrischen Methode bestimmten Aldolasenwerte in der Leber des Erwachsenen erscheinen etwas höher als die mit der radiometrischen Methode bestimmten.

Bei den F1P-Aldolasenbestimmungen mit der radiometrischen Methode fanden sich bei HFI niedrige Werte, nämlich 5 - 8 % der adulten Werte. Die Werte bei der spectrophotometrischen Methode waren recht unterschiedlich und oft konnte keine Aktivität nachgewiesen werden.

Die Werte für den Skelettmuskel lagen zwischen 1.16 und 2.35 nmol Glycerinaldehyd/min/mg Protein und für Herz um 0.93 nmol/min/mg Protein.

6.3 Der Einfluß von Cystein auf die Aldolasenaktivität bei HFI-Patienten

Die F1P-Aldolasenaktivität wird wie unter 5.3 beschrieben gemessen. Die Probenlösung wird mit Cystein, 4 mM, anstatt mit aqua bidest. verdünnt.

Tabelle 3:

Probe	Aktivität ¹ nmol/min/mg Pr.	Aktivität ² nmol/min/mg Pr.
Leber (N=6) (Adult)	4,46 $\pm$ 2,17	4,46 $\pm$ 2,17
<u>HFI</u>		
Leber 1	0.45	0.42
Leber 2	0.36	0.13
Leber 3	0.26	0.31
Leber 4	0.30	Ø
Leber 5	0.114	0.24
Darm 1	0.52	0.37

¹ = mit aqua bidest.

² = mit Cystein

Wir untersuchten die Wirkung von Cystein auf die FlP-Aldolasenaktivität um festzustellen, ob eine Affinitätsänderung der Aldolasen B durch die SH-Gruppe erreicht werden kann.

Es fand sich nur bei drei von fünf HFI-Patienten eine signifikante Aktivitätsverminderung der FlP-Aldolase in der Leber. Auch in der Dünndarmschleimhaut eines HFI-Patienten ließ sich diese Reduktion beobachten.

6.4 Änderung der FlP-Aldolasenaktivität bei Vorbehandlung der Proben bei 56°C:

Die FlP-Aldolasenaktivität wird wie unter 5.3 beschrieben gemessen. Bevor der Probenlösung das Gemisch zugefügt wird, wird sie fünf Minuten bei 56°C im Heizblock behandelt.

Tabelle 4:

Probe	Aktivitätsminderung in %
Kontrolle (N = 4)	6 - 25 %
<u>HFI</u>	
Leber 1	100,0
Leber 2	63,6
Leber 3	46,8
Leber 4	100,0
Darm 1	39,0

Aktivität in nmol Glycerinaldehyd/min/mg Protein

Die Aldolase von den Kontrollen zeigte eine geringfügige Aktivitätsänderung, was für eine gute thermische Stabilität spricht.

Die thermische Stabilität des Enzyms ist bei HFI stark reduziert. Dies äußert sich in einer deutlichen Aktivitätsminderung nach Behandlung bei 56°C.

6.5 F1P-Aldolasenaktivität in Leukozyten, kultivierten Fibroblasten und Amnionzellen:

Tabelle 5:

Probe	Aktivität in nmol/min/mg Protein	Km in mM
Leukozyten		
1	1.3	
2	1.12	2 - 2.5
3	2.7	
Fibroblasten	0.1	
Amnionzellen		
(N = 8)	0.06 - 1.6	2 - 3.3

Wie aus Tabelle 5 ersichtlich, war die Aktivität in Fibroblasten und Amnionzellen viel niedriger als in Leukozyten. Die F1P-Endkonzentration war bei Leukozyten und Amnionzellen 0.333 mmol/L und bei Fibroblasten 0.416 mmol/L.

7. DISKUSSION

Die radiometrische Methode, die hier beschrieben wurde, ist ein relativ einfach durchzuführendes Verfahren für die Aldolaseaktivitätsbestimmung. Im Gegensatz zur spectrophotometrischen Methode sind für diese Methode außerordentlich geringe Mengen Autopsie- bzw. Biopsiematerial erforderlich. Wir kamen mit weniger als 100 µg des zu untersuchenden Gewebes aus. Bei der bisherigen Methode waren mindestens 2 mg Probenmaterial nötig.

Radioaktives Fructose-1-P kann leicht von der ^{14}C -Fructose, die im Handel erhältlich ist, hergestellt werden (siehe 5.1). Die Aktivität wird in nmol Glycerinaldehyd/min/mg Protein gemessen.

Diese Methode ist viel sensitiver als die spectrophotometrische Methode. Alle mit ihr erhaltenen Werte sind gut reproduzierbar, was ein günstigeres Licht auf die Genauigkeit der Methode wirft.

Im Gegensatz hierzu steht die z.T. schlechte Reproduzierbarkeit der spectrophotometrischen Methode, wie aus den Messungen mit der HFI-Leber 2 (siehe Tab. 2, S. 30) ersichtlich ist. HFI-Leber 2 hatte bei der Aktivitätsbestimmung mit der spectrophotometrischen Methode relativ hohe Werte (3 nmol/min/mg Protein). Da eindeutig die klinischen Symptome der HFI bestanden und mit der radiometrischen Methode ein pathologisches Ergebnis gefunden worden war, haben wir den Test wiederholt (siehe S. 30/31). Diesmal lag die mit der spectrophotometrischen Methode gemessene Aldolasenaktivität an der oberen Normgrenze.

Die Genauigkeit der neuen Methode ist von der Inkubationszeit und Proteinkonzentration der Probe abhängig. Um gut reproduzierbare und nicht verfälschte Werte zu bekommen, haben wir die Proteinkonzentration bei unseren Untersuchungen zwischen 1 - 10 µg gehalten. Die

Inkubationszeit lag zwischen 30 und 60 Minuten, da bei Inkubationszeiten darüber kein signifikanter Anstieg der Aldolaseaktivität erreicht werden kann. Bei unseren Untersuchungen an Leberbiopsieproben der gesunden Erwachsenen fanden wir eine Aldolaseaktivität von 4.46 ± 2.17 (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung).

Bei der Aktivitätsbestimmung mit der spectrophotometrischen Methode lagen die Werte im Durchschnitt höher. Dafür können eine hohe Substratkonzentration oder eine geringere Genauigkeit der Methode verantwortlich gemacht werden.

Bei der Untersuchung der Leberaldolasen von HFI-Patienten mit der radiometrischen Methode fanden wir Werte, die nur 5 - 8 % der Werte von normalen Erwachsenen betragen.

Diese Aktivitätsminderung beruht offensichtlich auf einer genetisch bedingten Strukturänderung der Aldolase B (18, 27, 28), nachdem sich bei der Untersuchung der kinetischen Eigenschaften der Aldolase, nämlich der Michaelis-Konstante als Ausdruck der Affinität der F1P- Aldolase zu F1P, bei HFI-Trägern K_m -Werte um 50 fanden.

Die Affinität war sowohl in der Leber als auch im Darm extrem erniedrigt. Das Lineweaver-Burk-Diagramm hat im Gegensatz zu gesunden, unauffälligen Probanden eine hyperbolische Form (siehe dazu Abb. 4), was für einen Substrataktivationsseffekt spricht (3).

Ähnliche Veränderungen der Aldolase bei HFI wurden bei anderen experimentellen Untersuchungen festgestellt (8, 18). Eine Änderung der Eigenschaften der Leberaldolase B wurde nur bei in vitro-Untersuchungen mit Antiseren gegen Aldolase B beobachtet (8, 18, 26, 28, 29).

Die Differenz in der Aldolaseaktivität zwischen Gesunden und HFI-Patienten ist größer bei niedriger F1P-Konzentration. Deswegen haben wir bei unseren Messungen die F1P-Konzentration von 0.5 nmol/L verwendet (siehe dazu 6.2.1).

In einigen unklaren Fällen haben wir unterschiedliche FLP-Konzentrationen zur Sicherstellung der Diagnose verwendet.

Wir untersuchten die Aldolasenaktivität in Leber, Niere, Darm, Muskel und Herz der Feten und Erwachsenen, um die Affinität der Aldolase zum Substrat zu bestimmen. Keine Affinitätsänderung sieht man zwischen adulten Gewebeproben in Leber, Niere und Darm. Die K_m lag hier zwischen 1 und 2.22 mM.

Im Muskel und Herzen war die Affinität der Aldolase zu FLP als Substrat geringer als in der Leber. Im Unterschied zu Feten, wo es Aldolase A oder Aldolase C, was das Isoenzymmuster betrifft, gibt (15, 21), ist im adulten Gewebe, z.B. in Leber, Niere und Darm, Aldolase B vorhanden.

Die Entwicklung vom fetalen zum erwachsenen Tier und die Aktivitätsänderung der Aldolase wurden an Gewebsextrakten der Ratte untersucht (21). Hier beobachtete man, daß in Organen wie Leber, Niere und Gehirn die Differenzierung von einer einheitlichen Aldolase zu den Aldolasen mit höherer Aktivität zum FLP als Substrat erfolgt. Die Differenzierung erfolgt zu Aldolase B oder C.

Die Enzymaktivität, die der adulten entspricht, bildet sich in der Leber zur Zeit der Geburt, später in der Niere und zuletzt im Gehirn. In Herz, Lunge und Quadricepsmuskulatur waren Veränderungen des Isoenzymmusters nicht nachweisbar. Im Hoden bildet sich das adulte Enzymmuster erst während der Pubertät (21).

Aldolase A, B und C wurde in Extrakten von menschlicher Niere und Dünndarm in verschiedenen Entwicklungsstadien bestimmt. Eine Veränderung des Isoenzymmusters während der Entwicklung, die von einem Überwiegen der Aldolase A zu einem Überwiegen der Form B führt, konnte beobachtet

werden. Die Untersuchungen zeigten, daß der Wechsel des Aldolasemusters in Organextrakten durch Differenzierung der proximalen Tubuli der Niere und der Epithelzellen des Dünndarms hervorgerufen wird (20, 38, 40). Dies wurde mit einer immunhistochemischen Methode nachgewiesen (39).

Verschiedene Autoren untersuchten die Aldolaseaktivität und die Änderung des Aldolase-Isoenzymmusters bei malignen Tumoren. Sie fanden heraus, daß die Tumorzellen fortlaufend erst Aldolase B verlieren, aber bereits von Anfang an mehr Aldolase A produzieren (27, 40).

Die Verminderung der fetalen Isoenzyme der Aldolase A und C in der Leber wird von einem Anstieg der Aldolase B begleitet (30). 1982 gelang es Gregori et al. (10) die Aldolase B aus der isolierten zellulären RNS von adultem und fetalem menschlichen Gewebe zu resynthetisieren. Dabei zeigte sich, daß der Anstieg der Aldolase B während der fetalen Entwicklung parallel mit dem Anstieg der spezifischen Boten-RNS für Aldolase B läuft (10, 21, 30).

Wir fanden bei der Aktivitätsbestimmung für Leberaldolase bei Erwachsenen und Feten deutliche Aktivitätsunterschiede. Bei Feten war die Aktivität der Aldolase B stark reduziert. Sie betrug nur 25 - 30 % der adulten Werte. Die Affinität der Aldolase B zum Substrat war erniedrigt.

In Leber, Niere und Darm der Erwachsenen zeigte die Aldolase normale Aktivität. In Übereinstimmung damit stehen unsere Ergebnisse der kinetischen Eigenschaften. Die Michaelis-Konstante lag für adulte Leber zwischen 1 - 2 mM, für Niere bei 1.4 - 1.7, für Darm zwischen 1.16 - 2.22 und bei der fetalen Leber zwischen 8 - 10 mM.

Im Skelettmuskel, der hauptsächlich Aldolase A enthält, war die Affinität der Aldolase zum F1P als Substrat vermindert.

Steinman et al. (35) zeigten, daß die K_m für F-1-P und FDP signifikant ansteigt, wenn man zwei SH-Gruppen durch Zusatz von Disulphid-monosulphoxid-Reagenz ändert. Sie vermuteten den primären Defekt, der die Enzymaffinität zum Substrat vermindert, in den Thiolgruppen.

Wir haben versucht, die Enzymaktivität durch Zusatz von Cystein, das die SH-Gruppen in die Reaktion liefert, zu verändern. Es fand sich bei drei von fünf HFI-Patienten eine Aktivitätsverminderung in der Leber (s. S. 32). Bei einem Patienten ließ sich diese Veränderung auch in der Dünndarmschleimhaut nachweisen. Es bleibt unklar, weshalb diese Aktivitätsminderung nicht auch bei den anderen zwei HFI-Patienten zu beobachten war.

Wie unsere Untersuchungen zeigen, ist die thermische Stabilität der Leberaldolase bei HFI meist stark reduziert, was sich in einer deutlichen Aktivitätsminderung bei der Aldolase B nach der Behandlung der Proben bei 56°C äußert.

In einigen Fällen war keine Aktivität mehr meßbar (siehe 6.4). Diese Ergebnisse stimmen mit der Beobachtung von Gitzelmann et al. (8) überein. Sie untersuchten Leberaldolase auf ihre elektrophoretische Beweglichkeit und thermische Stabilität.

In Leukozyten fand sich eine sehr niedrige Aldolasenaktivität. Sie lag zwischen 1.12 und 2.7 nmol Glycerinaldehyd/min/mg Protein. Diese niedrige Aktivität spricht für ein Überwiegen von Aldolase A und C in Leukozyten und dafür, daß eine Diagnosestellung durch Leukozytenuntersuchung nicht möglich ist.

Wir untersuchten die Aldolasenaktivität gegenüber F1P mit der sensitiven radiometrischen Methode in kultivierten Fibroblasten und Amnionzellen. Dabei fanden wir eine sehr niedrige F-1-P-Aldolasenaktivität, die mit der spectrophotometrischen Methode nicht meßbar gewesen wäre, heraus. Wenn man an die Änderung des Isoenzymmusters der Aldolasen bei der Entwicklung in fetaler Leber, Niere und Darm denkt, kann man vermuten, daß ältere Fibroblasten- und Amnionzellkulturen mehr Aldolase B enthalten (20, 27, 39).

8. ZUSAMMENFASSUNG

Wir konnten mit einer neuen radiometrischen Methode die mit einer spectrophotometrischen Methode z.T. nicht mehr meßbaren FlP-Aldolasenaktivitäten in Leber, Niere, Darm, Muskel und Herz nachweisen.

Diese radiometrische Methode ist sehr spezifisch und sensitiv. Im Gegensatz zu der alten Methode braucht man hier wesentlich geringere Mengen an Probenmaterial. Dieses radiometrische Verfahren ermöglichte es uns, die Aldolasenaktivität genauer und mit geringerem Zeitaufwand zu bestimmen.

Das von uns hergestellte radioaktive F-1-P wird von Aldolase, die in verschiedenen Geweben vorhanden ist, in die beiden Triosen Dihydroxyacetonphosphat und radioaktiv markierten Glycerinaldehyd gespalten. Die beiden Triosen werden mit Hilfe der Ionenaustausch-säulenchromatographie getrennt. Der so entstandene markierte Glycerinaldehyd dient uns als Maß für die Aldolasenaktivität. Die Aktivität wird in nmol Glycerinaldehyd/min/mg Protein angegeben.

Wir konnten die hinsichtlich des Isoenzymmusters bekannte Gewebsspezifität in adulten Geweben bestätigen. In Leber, Niere und Darm der Erwachsenen fanden wir eine normale Aldolasenaktivität.

Die Aktivität der Leberaldolase bei Erwachsenen und Feten zeigte deutliche Unterschiede, was die Ergebnisse einer Differenzierung der fetalen Leberaldolase hin zu adulten Aktivitätswerten bestätigt.

Das Überwiegen von Aldolase A und C in Leukozyten, jungen Fibroblasten und Amnionzellen läßt keine diagnostische Erweiterung mittels dieser Zellen zu.

Weitere Untersuchungen an älteren Fibroblasten (nach Konfluenz) werden zeigen, ob sie mehr Aldolase B enthalten.

9. ABKÜRZUNGEN

HFI	hereditäre Fructoseintoleranz
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
GA	Glycerinaldehyd
G-6-P	Glucose-6-phosphat
F-6-P	Fructose-6-phosphat
F-1,6-P ₂ ; FDP	Fructose-1,6-bisphosphat
F1P (F-1-P)	Fructose-1-phosphat
ATP	Adenosintriphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
RNA (RNS)	Ribonukleinsäure
NADH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid H
Upm	Umdrehungen pro Minute
phys.	physiologisch
°C	Grad Celsius
HCl	Salzsäure
min	Minuten
konz.	konzentriert
nm	Nanometer
mM	Millimol
μCi	Micro-Curie

10. LITERATURVERZEICHNIS

1. Baerlocher, K., Gitzelmann, R. and Steinmann, B.: Clinical and genetic studies of disorders in fructose metabolism. Inherited Disorders of Carbohydrate Metabolism., Ed. Holton, J.B., Pennock, L.A., Burman, D., 163-190, 1980.
2. Chambers, R.A. and Pratt, R.T.C.: Idiosyncrasy to Fructose. *Lancet*, 2: 340, 1956.
3. Dixon, M., Webb, E.C.: in: *Enzymes*, 3rd ed. Longmans, Green and Co., London. 1979.
4. Dubois, R., Loeb, H., Ooms, H.A., Gillet, P., Bartmann, J. and Champenois, A.: Etude d'un cas d'hypoglycémie fonctionnelle par intolérance au fructose. *Helvet. paediat. acta*, 16: 90-96, 1961.
5. Froesch, E.R., Prader, A., Labhart, A., Stuber, H.W. und Wolf, H.P.: Die hereditäre Fructoseintoleranz, eine bisher nicht bekannte kongenitale Stoffwechselstörung. *Schweiz. med. Wchnschr.*, 87: 1168-1171, 1975.
6. Froesch, E.R., Wolf, H.P., Baitsch, H., Prader, A. and Labhart, A.: Hereditary Fructose Intolerance. *Am. J. Med.*, 34: 151-167, 1963.
7. Froesch, E.R.: Fructosurie und Fructoseintoleranz. In: *Genetic defects of biologically active proteins*. P. 242-254. Edited by Linneweh, F. München und Berlin 1962. Urban & Schwarzenbeck.
8. Gitzelmann, R., Steinmann, B., Bally, C. and Leberherz, H.G.: Antibody activation of mutant human fructosediphosphate aldolase B in liver extracts of patients with hereditary fructose intolerance. *Bioch. biophys. Res. Comm.*, 59/4: 1270-1277, 1974.

9. Gitzelmann, R. In: Curtius, H.Ch. and Roth, M. (eds.) *Clinical Chemistry and Biochemistry: Principles and Methodes*, de Gruyter, Berlin 1963, pp. 1236-1240.
10. Gregori, C., Besmond, C., Kahn, A. and Dreyfus, J.C.: Characterization of messenger RNA for aldolase B in adult and fetal human liver. *Bioch. biophys. Res. Comm.*, 104: 369-375, 1982.
11. Hers, H.G. and Joassin, G.: Anomalie de l'aldolase hépatique dans l'intolérance au fructose. *Enzymol. biol. clin.*, 1: 4-14, 1961.
12. Köhlin, P. and Melin, K.: Hereditary fructose intolerance in four swedish families. *Acta paediat. Scand.*, 57: 24-32, 1968.
13. Kaletta-Gmünder, U., Wolf, H.P. und Leuthardt, F.: Über Aldolasen: Chromatographische Trennung von 1-Phosphatfructoaldolase und Diphosphofructaldolase der Leber. *Helv. Chim. Acta*, XL/IV, Nr. 116: 1027-1033, 1957.
14. Karlson, P.: *Kurzes Lehrbuch der Biochemie*. Georg Thieme-Verlag, Stuttgart 1977, 10. Auflage.
15. Lebherz, H.G. and Rutter, W.J.: Distribution of Fructose Diphosphate Aldolase Variants in Biological Systems. *Biochemistry*, 8: 109-121, 1969.
16. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J.Biol. Chem.*, 193: 265, 1951.
17. Nikkilä, E.A., Somersalo, O., Pitkanen, E. and Perheentupa, J.: Hereditary Fructose Intolerance, an Inborn Deficiency of Liver Aldolase Complex. *Metabolism*, 11/7: 727-731, 1962.

18. Nordmann, Y., Schapira, F. and Dreyfus, J.C.: A structurally modified liver aldolase in fructose intolerance: immulogical and kinetic evidence. *Bioch. biophys. Res. Comm.*, 31/6: 884-889, 1968.
19. Penhoet, E., Rajkumar, T. and Rutter, W.J.: Multiple forms of fructose diphosphate aldolase in mammalian tissues. *Proc. N.A.S.*, 56: 1275-1282, 1966.
20. Rehbein-Thöner, M. and Pfeleiderer, G.: The Changes in Aldolase Isoenzyme Pattern during Development of the Human Kidney and Small Intestine-Demonstrated in Organ Extracts and Tissue Sections. *Hoppe-Seyler's Z. Physio. Chem.*, 358: 169-180, 1977.
21. Rensing, U., Schmid, A. and Leuthardt, F.: Veränderungen im Isoenzymmuster der Aldolasen aus Rattenorganen während der Entwicklung. *Hoppe-Seyler's Z. Physio. Chem.*, 348: 921-928, 1967.
22. Roe, J.H., Epstein, J.H., Goldstein, N.P.: A photometric method for the determination of inulin in plasma and urine. *J. Biol. Chem.*, 178: 839, 1949.
23. Rutter, W.J.: *The Enzymes*, ed. Boyer, P.D., Lardy, H. and Myrbäck, K., New York: Academic Press 1961, vol 5, p. 341.
24. Rutter, W.J., Woodfin, B.M. and Blostein, R.E.: Enzymic Homology: Structural and Catalytic Differentiation of Fructose Diphosphate Aldolase. *Acta Chem. Skand.*, 17: 226-232, 1963.
25. Samols, E. and Dormandy, T.L.: Insulin response to fructose and galactose. *Lancet*, 1: 478 f, 1963.
26. Schapira, F.: Kinetic and immunological abnormalities of aldolase B in hereditary fructose intolerance. *Biochem. Soc. Transactions*, 3: 232-234, 1975.
27. Schapira, F.: Isozymes and Cancer. *Adv. Cancer Res.*, 18: 77-98, 1973.

28. Schapira, F., Gregori, C. and Hatzfeld, A.: Isoelectrofocusing of aldolase B from normal human livers and from livers with hereditary fructose intolerance. *Clin. Chim. Acta*, 78: 1-8, 1977.
29. Schapira, F., Hatzfeld, A. and Gregori, C.: Studies on Liver Aldolase in Hereditary Fructose Intolerance. *Enzyme*, 18: 73-83, 1974.
30. Schapira, F., Hatzfeld, A. and Weber, A.: in: *Isozymes*, C.L. Markert ed., Acad. Press III, p. 987-1000, 1975.
31. Shin-Buehring, Y., Osang, M., Ziegler, R. and Schaub, J.: A simple assay for galactokinase using DEAE-cellulose column chromatography. *Clin. Chim. Acta*, 74: 1-5, 1977.
32. Shin, S.Y., Moro, V., Doliwa, H. and Endres, W.: A Radioisotopic Method for Fructose-1-phosphat Aldolase Assay That Facilitates Diagnosis of Hereditary Fructose Intolerance. *Clinical Chemistry*, Vol. 29, No. 11, 1955-1958, 1983.
33. Siegenthaler, W.: *Klinische Pathophysiologie*, Georg Thieme-Verlag, 2. Auflage, 1973.
34. Staub, A. and Vestling, C.S.: Studies on fructose-1-phosphat with rat liver fructokinase. *J. Biol. Chem.*, 194: 395-399, 1951.
35. Steinman, H.M. & Richards, F.M.: Participation of Cysteinyl Residues in the Structure and Function of Muscle Aldolase. Characterization of Mixed Disulfide Derivatives. *Biochemistry* 9: 4360-4372, 1970.
36. Tsutsumi, K. and Ishikawa, K.: Purification of messenger RNA coding for rat liver aldolase B subunit. *Bioch. Biophys. Res. Comm.*, 100/1: 407-412, 1981.

37. Wachsmuth, E.D., and Stoye, J.P.: The Differentiation of Proximal and Distal Tubules in the Male Rat Kidney: The Apperance of Aldolase Isoenzymes, Aminopeptidase and Alkaline Phosphatase during Ontogeny. *Histochemistry* 47, 315-337, 1976.
38. Wachsmuth, E.D.: Differentiation of Epithelial Cells in Human Jejunum: Localization and Quantification of Aminopeptidase, Alkaline Phosphatase and Aldolase Isozymes in Tissue Sections, *Histochemistry* 48, 101-109, 1976.
39. Wachsmuth, E.D.: The localisation of enzymes in tissue sections by immuno-histochemistry. Conventional anti-body and mixed aggregation technique, *Histochemical Journal*, 8, 253-270, 1976.
40. Wachsmuth, E.D. and Stoye, J.P.: Klasseneinteilung der Tumorentwicklung aufgrund der quantitativen Analyse von Enzymen in Gewebeschnitten menschlicher hypernephroider Karzinome, *Beitr. Path. Bd.* 159, 229-248, 1976.
41. Woods, H.F.: Pathogenic mechanism of disorders in fructose metabolism, aus: *Inherited Disorders of Carbohydrate Metabolism*, Ed. Burman, D., Holton, J.B., Pennock, C.A., 191-201, 1980.

11. LEBENSLAUF

Name	Moro
Vorname	Vinko
Geburtsdatum	1. Februar 1957
Geburtsort	Sinj/Kroatien
Staatsangehörigkeit	jugoslawisch
Bekenntnis	röm.-kath.
Vater	Branko Moro
Mutter	Luca Moro, geb. Vucic
<u>Schulausbildung</u>	
Volksschule	Sept. 1964 bis Juni 1972 in Han bei Sinj
Gymnasium	Sept. 1972 bis Juni 1976 im Gymnasium "Dinko Simunovic" in Sinj
Abitur	am 28. Mai 1976
<u>Studium</u>	
Studienkolleg	Februar 1977 bis Januar 1978 im Studienkolleg bei den wissenschaftlichen Hochschulen Münchens.
Immatrikulation	am 10. März 1978 an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Studiengang	Humanmedizin
Ärztliche Vorprüfung	am 18. März 1980
Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung	am 26. März 1981
Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung	am 18. März 1983

Praktisches Jahr

18. April 1983 bis 7. August 1983
Kinderklinik der Universität München
im Dr. v. Haunerschen Kinderspital,
Lindwurmstraße 4, 8000 München 2

8. August 1983 bis 17. November 1983
Klinikum Ingolstadt, Medizinische
Klinik I, 8070 Ingolstadt/Donau

28. November 1983 bis 22. Januar 1984
Klinik und Poliklinik für Kiefer-
chirurgie der Universität München,
Goethestraße 70, 8000 München 2

23. Januar 1984 bis 18. März 1984
Chirurgische Klinik Innenstadt der
Universität München

Schriftlicher Teil des
Dritten Abschnitts der
Ärztlichen Prüfung

am 5. April 1984

Mündlicher Teil des
Dritten Abschnitts der
Ärztlichen Prüfung

am 3. Mai 1984

